

09/601065

09 MARS 1999

INPIINSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

REC'D 23 MAR 1999

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****PRIORITY
DOCUMENT****COPIE OFFICIELLE**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **25 FEV. 1999**Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE**SIEGE**26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 01237

TITRE DE L'INVENTION :

"Médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose"

LE(S) SOUSSIGNÉ(S) **La Demanderesse**
 Laboratoires GOËMAR S.A.
 ayant pour mandataire:

Cabinet PLASSERAUD
84, rue d'Amsterdam
75440 PARIS CEDEX 09


DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- | | |
|---|---|
| 1) YVIN Jean-Claude
3 rue Gabriel Desgrés
35400 SAINT MALO | 5) THIBAL Vesna
5 rue Gentile
69002 LYON |
| 2) CRUZ Florence
7 rue de la Loutre
35400 SAINT MALO | 6) ARRIGO Patrick
Jussy
74930 PERS-JUSSY |
| 3) DESCAMPS Valérie
22 rue Yan d'Argent
29680 ROSCOFF | 7) CLOAREC Bernard
81 rue de la Rive
29250 SAINT POL DE LEON |
| 4) RICHARD Christophe
Kernevez
29400 PLOUGOURVEST | |

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

PARIS, le 3 février 1999


G. KOCH (N° 92-1128)

**MÉDICAMENT POUR LE TRAITEMENT DES DÉRÈGLEMENTS
DE L'APOPTOSE**

5 L'invention a pour objet un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose.

On désigne par le terme "apoptose" la mort cellulaire programmée ou suicide cellulaire.

Cette mort correspond à une auto-élimination des cellules suivant un programme défini.

10 Elle se traduit tout d'abord par des renflements au niveau de la membrane plasmatique, renflements qui sont accompagnés d'un changement structural de la membrane, puis par une perte de volume de la cellule qui semble se contracter et s'effondrer sur elle-même.

15 Le noyau se condense et l'ADN est clivé en petits morceaux (Raff, "Nature", 356, 397, 1992; Bortner et al., "Trends in Cell. Biol." 5, 21, 1995).

20 In vivo, la cellule en apoptose est reconnue par les macrophages qui vont la phagocyter et l'éliminer en l'absence de tout processus inflammatoire.

In vivo toujours, l'apoptose est largement utilisée par les organismes vivants pour contrôler les populations cellulaires, en particulier les lymphocytes suite à leur activation.

25 Au cours du développement des organismes, l'apoptose joue un rôle primordial dans l'élimination des tissus embryonnaires non nécessaires (queue du lézard, ébauché des organes génitaux d'un sexe ou de l'autre), sculpture de l'organisme (élimination des palmures interdigitales entre
30 les futurs doigts et autres).

Certains composés présents dans les organismes vivants induisent spécifiquement un phénomène apoptotique. Ainsi, par exemple chez les mammifères, la liaison du ligand Fas au récepteur membranaire Fas, également désigné par
35 APO-1 ou CD95, induit spécifiquement une apoptose; cette

apoptose est utilisée par l'organisme vivant pour contrôler les populations de lymphocytes, notamment de lymphocytes T.

5 Les susdits récepteur et ligand représentent un système physiologique extrêmement intéressant qui est impliqué dans l'élimination spécifique de cellules qui ne sont plus désirées dans l'organisme.

10 On peut citer en particulier l'élimination cellulaire au cours de la maturation et de l'activation des lymphocytes T. En fait, le système Fas, c'est-à-dire Fas ligand/Fas récepteur, joue un rôle primordial dans l'homéostasie du système immunitaire.

15 Le récepteur Fas est un membre d'une famille de protéines agissant comme récepteurs à la surface des cellules et comprenant également les récepteurs TNF (facteur de nécrose tumorale) et NGF (facteur de croissance des nerfs).

20 Le mécanisme par lequel le système Fas induit la mort cellulaire est inconnu mais fait appel à l'activation des protéases connues sous l'appellation ICE-like ("interleukine-1 bêta-converting enzyme" en anglais) ou caspases.

25 On peut noter que le ligand Fas peut être sécrété par les cellules pour induire leur propre suicide; mais ce ligand se retrouve aussi à la surface de cellules activatrices qui vont de ce fait induire le suicide des cellules cibles par simple contact. Une fois activé, le récepteur Fas interagit avec de nombreuses protéines intracellulaires pour transmettre le signal déclenchant l'apoptose.

30 In vitro, il existe d'autres moyens pour induire une apoptose, par exemple en inhibant l'activité de certaines kinases, et en particulier la kinase C; dans ce cas, on peut avoir recours à la staurosporine.

35 Ce produit est très efficace pour induire la mort des cellules par apoptose.

Il est néanmoins à remarquer que la transduction des signaux induits par la staurosporine est différente de celle faisant intervenir le récepteur Fas.

5 Toutefois, si les moyens d'activer l'apoptose sont différents, l'exécution du programme de mort induit par ces deux modes d'activation est équivalente et caractérisée par une activation de la cascade des caspases et un dérèglement de la mitochondrie qui relâche des composés (par exemple le cytochrome C) qui vont promouvoir la destruction programmée
10 de la cellule. Ce phénomène est énergie-dépendant mais ne requiert pas la synthèse de nouvelles protéines. En fait, tout est prêt dans une cellule pour assurer sa propre destruction.

15 In vivo, la régulation du phénomène apoptotique a une importance considérable.

En effet, de nombreuses pathologies sont associées à son dérèglement.

On peut citer, par exemple, deux cas de dérèglement de l'apoptose dans lesquels celle-ci est modulée via le système Fas: il s'agit des maladies auto-immunes dans
20 lesquelles l'apoptose est déficiente et de la destruction des lymphocytes T CD4+ infectés par HIV-1 dans lesquels l'apoptose est trop active.

25 Dans d'autres cas tels que les dégénérescences neuronales rencontrées par exemple dans la sclérose en plaques, l'apoptose est activée par des voies non encore connues.

Il existe d'autres pathologies dans lesquelles l'apoptose est déficiente; à cet égard, on peut citer
30 l'accumulation de cellules cancéreuses dont l'apoptose semblerait dépendre du système FAS ("Green", Science, vol.278, 1246, 1997).

La Société Demanderesse, au vu des constatations rappelées ci-dessus, a eu le mérite de trouver que, dès lors
35 que l'on dispose d'un médicament capable de moduler les

dérèglements de l'apoptose tant du point de vue d'une activation dans le cas des pathologies du groupe de celles comprenant les maladies auto-immunes et les pathologies du type cancer que du point de vue de son inhibition dans le cas des pathologies du groupe de celles comprenant le SIDA, il devenait possible de lutter contre ces maladies.

L'invention a donc pour objet un médicament caractérisé par le fait qu'il comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace d'une substance propre à moduler les dérèglements de l'apoptose.

Et la Société Demanderesse a eu le mérite non moins grand de trouver qu'au moins certaines des substances saccharidiques, tant polysaccharidiques qu'oligosaccharidiques et monosaccharidiques comportant éventuellement, sur au moins certains de leurs motifs unitaires, au moins un substituant du groupe comprenant les groupements sulfate, méthyle et acétyle, étaient propres à moduler les dérèglements de l'apoptose.

L'invention a donc également pour objet un médicament caractérisé par le fait qu'il comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace d'au moins une des substances saccharidiques du groupe comprenant les polysaccharides, les oligosaccharides et les monosaccharides propres à moduler les dérèglements de l'apoptose et comportant éventuellement, sur au moins certains de leurs motifs unitaires, au moins un substituant du groupe comprenant les groupements sulfate, méthyle et acétyle.

Des résultats particulièrement prometteurs ont été obtenus avec

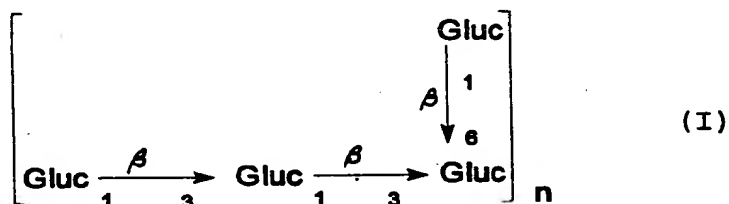
- les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des polymères du groupe comprenant les β 1-3 glucans comportant éventuellement des ramifications β 1-6,
- les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des galactanes sulfatés, notamment les carraghénanes, les agars et les porphyranes.

L'invention a donc également pour objet les médicaments caractérisés par le fait qu'ils comportent, à titre de principe actif, une quantité efficace d'au moins l'une des substances du groupe propre à moduler les dérèglements de l'apoptose et comprenant

- les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des polymères du groupe comprenant les β 1-3 glucans comportant éventuellement des ramifications β 1-6, et

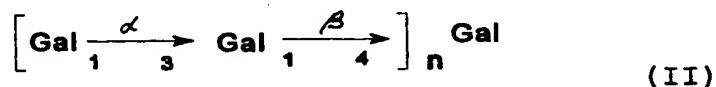
- les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des galactanes sulfatés, notamment les carraghénanes, les agars et les porphyranes.

Selon un mode de réalisation avantageux, le médicament conforme à l'invention comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace d'au moins un oligosaccharide propre à moduler les dérèglements de l'apoptose et répondant à la formule



dans laquelle n représente un nombre entier de 1 à 50, de préférence de 5 à 10 et dans laquelle le nombre de branchements varie de 0 à 3 par unité de répétition.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, le médicament conforme à l'invention comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace d'au moins un disaccharide de répétition propre à moduler les dérèglements de l'apoptose et répondant la formule



dans laquelle n représente un nombre entier de 1 à 50, de préférence de 1 à 20, au moins certains des disaccharides de répétition de formule (II) pouvant comporter un ou plusieurs groupes sulfate.

40 Selon un autre mode de réalisation avantageux, le médicament conforme à l'invention comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace du produit propre à inhiber au moins partiellement l'apoptose et obtenu par hydrolyse à partir de iota-carraghénate de sodium, ce
45 produit étant constitué par un mélange d'oligo-iota-carraghénanes désigné par I₉, dont la teneur en oses totaux (déterminée selon Tillmans et Philippi) est de 62% et dont le profil de distribution par taille, estimé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon Zablakakis et
50 Perez, est:

	Iota-néocarratétrase (DP 2)	6- 8%
	Iota-néocarrahexase (DP 3)	23-27%
	Iota-néocarraoctase (DP 4)	18-22%
	Iota-néocarradécaose (DP 5)	12-18%
55	Iota-néocarradodécaose (DP 6)	11-15%
	Oligo-iota-carraghénanes constitués par 7 à 15 disaccharides de répétition (DP 7-15)	18-22%.

Les susdites méthodes sont décrites, pour ce qui est de Zablakakis E. & Perez J., dans "*Botanica marina*", 33, 273-276 (1990) et, pour ce qui est de Tillmans J. & Philippi K.,
60 dans "*Biochem. Z.*", 215, 30-60 (1930).

Selon un autre mode de réalisation avantageux, le médicament conforme à l'invention comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace du produit propre à activer les dérèglements de l'apoptose, obtenu par extraction
65 aqueuse acide à partir d'une algue brune dénommée *Laminaria digitata*, ce produit étant constitué par un mélange d'oligo β 1-3 glucans désignés par L₁₁ et comportant de 1 à 50, de préférence de 20 à 30 unités saccharidiques, le produit en
70 question présentant le spectre RMN montré à la figure 1.

Il est à noter que le produit L₁₁ peut également être obtenu par extraction aqueuse à partir des algues brunes en général dont *Laminaria digitata* est un représentant.

5 La préparation du produit L₁₁ peut être effectuée comme suit.

A 300 g d'algues fraîches de type *Laminaria digitata* récoltées au mois d'août sous forme fraîche ou sèche, on ajoute progressivement 1 l d'acide sulfurique 0,3%.

10 L'opération est réalisée au bain-marie à une température d'environ 70°C pendant 2 heures et 30 minutes sous agitation.

Cette opération est renouvelée deux fois.

15 L'extrait obtenu est clarifié par filtration sur un filtre de porosité 1,2 µm.

Le liquide résultant de cette filtration est soumis à une ultrafiltration tangentielle sur une membrane de porosité 50000 Daltons.

20 L'ultrafiltration est réalisée en maintenant une pression de 1 bar.

On obtient ainsi un ultrafiltrat dont le pH est ramené à 5,5 présentant un volume d'environ 0,8 litre. Cet ultrafiltrat est soumis à une dialyse sur une membrane en ester de cellulose de porosité égale à 500 Daltons.

25 On obtient un dialysat qui est concentré à un volume de 100 ml par évaporation à 80°C à l'aide d'un dispositif de type ROTOVAPOR, puis lyophilisé.

On obtient 7 g d'une poudre couleur crème constituant le produit L₁₁.

30 Une analyse par chromatographie ionique couplée à l'ampérométrie et utilisant une résine échangeuse d'ions commercialisée par la Société DIONEX, montre que les oligo β 1-3 glucanes constitutifs de la susdite poudre ont en fait 1 à 50, de préférence de 20 à 30 unités saccharidiques.

35 L'examen du spectre RMN du ¹³C du produit L₁₁,

réalisé à partir d'une solution à 80 mg/ml dans D₂O et représenté à la figure 1, montre un squelette de β -D-(1-3)-glucane dont les résonances des différents carbones ont pu être identifiées (elles sont réunies dans le tableau A ci-après) par comparaison avec les valeurs de la littérature [voir Williams et al., 1992 "*Development of a water-soluble, sulfated (1-3)- β -D-glucan biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae**", Carbohydr. Res. 235: 247:25].

TABLEAU A

Déplacements chimiques (ppm) du spectre RMN du ¹³C de l'échantillon L₁₁

Squelette de β -D-(1-3)-glucane	C1	102,76
	C2	73,41
	C3	84,94
	C4	68,45
	C5	75,89
	C6	61,06
Résidu D-mannitol	C6	63,42

Les médicaments conformes à l'invention définis plus haut comportent les adjuvants de formulation classiques correspondant à leur mode d'administration et à la posologie retenues.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose, caractérisé par le fait que l'on fait comporter à une composition galénique au moins l'un des principes actifs identifiés ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux, la susdite composition galénique est propre à une administration par voie intraveineuse.

L'invention vise également l'utilisation, en vue de la préparation d'un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose, des substances saccharidiques du

groupe comprenant les polysaccharides, les oligosaccharides et les monosaccharides comportant éventuellement, sur au moins certains de leurs motifs unitaires, au moins un substituant du groupe comprenant les groupements sulfate, méthyle et acétyle.

Plus particulièrement, elle vise l'utilisation, en vue de la préparation d'un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose, des oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des polymères du groupe comprenant les β 1-3 glucans comportant éventuellement des ramifications β 1-6, et des oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des galactanes sulfatés, notamment les carraghénanes, les agars et les porphyranes.

Plus particulièrement encore, elle vise l'utilisation, en vue de la préparation d'un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose, des oligosaccharides de formule (I) et de ceux de formule (II).

Plus particulièrement encore, elle vise l'utilisation des produits désignés par I_9 et L_{11} en vue de la préparation de médicaments pour le traitement des dérèglements de l'apoptose.

L'invention sera encore mieux comprise à l'aide du complément de description qui suit et des exemples qui ne sont nullement limitatifs mais correspondent à des modes de réalisation avantageux.

Dans les expériences qui vont être décrites ci-après, on a travaillé sur des cultures cellulaires dans lesquelles on a déclenché un processus apoptotique en ayant recours au système Fas, puis on a étudié les effets de modulation pouvant être obtenus avec des oligosaccharides constituant le principe actif des médicaments conformes à l'invention.

Dans le cadre de ces expériences, on a déterminé, d'une part, les quantités appropriées de principe actif pour obtenir l'effet recherché de modulation de l'apoptose et,

d'autre part, le ou les moments auxquels il convient d'administrer, pour obtenir l'effet de modulation recherché, le principe actif ou le médicament le comportant.

5 **EXEMPLE 1**

On a travaillé sur une culture de fibroblastes murins exprimant constitutivement le récepteur Fas; le principe actif testé était le produit désigné par I₉.

10 Dans une expérience préalable, on a montré que les fibroblastes murins sont détruits par apoptose lorsqu'ils sont mis en présence soit du ligand Fas soit d'un anticorps agoniste reconnaissant le récepteur Fas et désigné dans ce qui suit par Fas Ab.

15 Dans une autre expérience préalable, on a déterminé que le produit I₉ n'altérerait pas la croissance cellulaire, qu'il n'était pas toxique vis-à-vis des fibroblastes murins aux concentrations utilisées et qu'il pouvait donc être ajouté à un milieu de culture cellulaire sans créer de problèmes.

20 Le milieu utilisé pour la culture des fibroblastes murins est celui commercialisé par la Société Life Technologies sous l'appellation "Dulbecco's Modified Eagle Medium"; ce milieu est décrit dans "Virology" 8, 396 (1959) par Dulbecco et al.

25 On a ajouté à ce milieu 5% en volume de sérum de veau foetal.

30 Ce milieu était ensuite inoculé avec des fibroblastes murins en présence d'une quantité suffisante d'antibiotiques pour éliminer les possibilités de contamination; la concentration du milieu de culture en fibroblastes a été de 10⁵ cellules par ml de milieu.

35 La culture a été effectuée à l'intérieur d'un incubateur dans lequel la température a été maintenue à 37°C; l'atmosphère remplissant l'incubateur contenait 5% de CO₂.

Après une incubation de 24 heures, on a ajouté soit le Fas ligand, soit le Fas Ab directement dans le milieu.

La quantité de Fas Ab ajoutée a été de 50 µg par ml de milieu de culture.

5 Dans ces conditions, environ 70% des cellules de la culture sont détruites par apoptose après environ 24 heures d'incubation.

Cette destruction est mise en évidence par coloration au cristal violet des cellules survivantes.

10 On a procédé ensuite à un certain nombre d'essais destinés à mettre en évidence l'action du principe actif.

Dans ces essais, on a fait varier, d'une part, la concentration à laquelle le principe actif est mis en oeuvre dans le milieu de culture et, d'autre part, le moment auquel le principe actif est ajouté à ce milieu de façon à 15 déterminer les concentrations optimales en principe actif ainsi que le ou les moments les plus opportuns d'introduction du principe actif par rapport à l'addition de Fas Ab.

20 On a fait varier les concentrations en principe actif de 0,001 à 2 mg par ml.

On a successivement étudié l'effet obtenu en ajoutant d'abord le principe actif avant, puis en même temps et enfin après Fas Ab.

25 Dans un premier essai, on a ajouté le principe actif 24 heures avant Fas Ab.

Dans le cadre de cet essai, on a noté l'effet obtenu en utilisant successivement 0, puis 5, puis 10, puis 50, puis 100 et enfin 500 ng de Fas Ab par ml de culture et, 30 dans chaque cas, des concentrations en principe actif successivement égales à 0,25, puis 0,5 et enfin 1 mg par ml de milieu de culture, étant entendu que l'on a également noté l'effet obtenu en l'absence de principe actif, c'est-à-dire pour une concentration de 0%.

35 Après 24 heures d'incubation, on procède à l'analyse

de survie.

Le résultat de cette analyse est matérialisé par l'histogramme de la figure 2.

5 Sur l'axe des abscisses de cet histogramme, figure la concentration du milieu en Fas Ab exprimée en ng/ml et, sur l'axe des ordonnées, le taux de survie exprimé en %.

10 Pour chacune des concentrations en Fas Ab, on a matérialisé le taux de survie pour chacune des quatre concentrations en principe actif, soit 0 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml et 1 mg/ml, par quatre rectangles parallèles à l'axe des ordonnées, l'écart-type étant matérialisé chaque fois par un segment surmontant le rectangle correspondant parallèlement à l'axe des ordonnées.

15 Le rectangle correspondant à 0 mg/ml de principe actif est chaque fois celui situé le plus à gauche, celui correspondant à 0,25 mg/ml de principe actif est situé sur sa droite, celui correspondant à 0,5 mg/ml est situé à la droite du précédent et ainsi de suite.

20 Les quatre rectangles sont chaque fois identifiés par des hachures, pointillés ou dégradés particuliers.

25 L'examen des résultats ainsi réunis sur l'histogramme de la figure 2 montre qu'en l'absence de principe actif, le taux de survie diminue avec l'augmentation de la concentration en Fas Ab et que ce taux de survie est sensiblement amélioré par l'addition du principe actif.

Dans un deuxième essai, on a ajouté au milieu de culture en même temps le Fas Ab et le principe actif.

30 Dans ce deuxième essai, on a noté l'effet obtenu en utilisant successivement les mêmes concentrations en Fas Ab et en principe actif que dans le premier essai.

Après 24 heures d'incubation, on procède à l'analyse de survie.

35 Les résultats enregistrés sont réunis sur l'histogramme de la figure 3 qui est constitué suivant les

mêmes principes que ceux exposés à propos de celui de la figure 2.

5 L'examen de ces résultats montre que le taux de survie évolue d'une manière analogue à celle notée pour le premier essai.

Dans une troisième série d'essais, on a ajouté le principe actif après Fas Ab, à savoir successivement:
tout d'abord, 1 heure après le Fas Ab,
10 ensuite, 3 heures après le Fas Ab et,
enfin, 6 heures après le Fas Ab,
en faisant toujours varier la concentration en Fas Ab de 0 à 500 ng par ml de culture.

Dans le cas de l'addition de principe actif effectuée 1 heure après le Fas Ab,

- 15 - on a réuni sur l'histogramme de la figure 4 les résultats notés pour des concentrations en I_9 de 0 mg/ml, de 0,005 mg/ml, de 0,01 mg/ml et enfin de 0,05 mg/ml,
- on a réuni sur l'histogramme de la figure 5 les résultats notés pour des concentrations en I_9 de
20 0 mg/ml, de 0,1 mg/ml, de 0,25 mg/ml et enfin de 0,5 mg/ml, et
- on a réuni sur l'histogramme de la figure 6 les résultats notés pour des concentrations en I_9 de 0 mg/ml, de 0,25 mg/ml, de 0,5 mg/ml et enfin de 1 mg/ml.

25 Les histogrammes des figures 4 à 6 sont constitués suivant les mêmes principes que ceux exposés à propos de celui de la figure 2.

Dans le cas de l'addition de principe actif effectuée 3 heures après l'addition de Fas Ab, on a réuni
30 sur l'histogramme de la figure 7 les résultats notés pour des concentrations en I_9 de 0 mg/ml, de 0,25 mg/ml, de 0,5 mg/ml et de 1 mg/ml.

Dans le cas de l'addition de principe actif effectuée 6 heures après l'addition de Fas Ab, on a réuni
35 sur l'histogramme de la figure 8 les résultats notés pour

des concentrations en I_9 de 0 mg/ml, de 0,25 mg/ml, de 0,5 mg/ml et de 1 mg/ml.

Les histogrammes des figures 7 et 8 sont constitués suivant les mêmes principes que ceux exposés à propos de celui de la figure 2.

L'examen de l'ensemble des résultats réunis sur les histogrammes des figures 4 à 8 montre que, dans le cas de l'addition du principe actif après l'addition de Fas Ab, le taux de survie augmente toujours; cet effet a toutefois tendance à diminuer lorsqu'augmente le temps écoulé entre les additions successives de Fas Ab et de principe actif; il est par ailleurs sensible à la concentration en principe actif lorsque celle-ci est inférieure à 0,25 mg/ml; on n'obtient pas d'amélioration sensible pour les concentrations supérieures à 0,25 mg/ml.

Ces constatations sont extrêmement importantes car elles montrent que le médicament conforme à l'invention permet d'obtenir une atténuation significative de l'apoptose.

EXEMPLE 2

Dans cet exemple, la culture cellulaire étudiée était une culture de cellules humaines immortalisées, constituées de lymphocytes T (type Jurkat).

Le milieu de culture utilisé est celui commercialisé par la Société Life Technologies sous l'appellation "RPMI 1640 Medium"; ce milieu est décrit par Moore et al. dans la publication "A.M.A." 199, 519 (1967).

On ajoute à ce milieu 10% en volume de sérum de veau foetal et des antibiotiques pour éliminer les possibilités de contamination.

On inocule ce milieu avec une quantité de 10^6 lymphocytes T par ml de milieu.

La température de l'incubation est de 37°C et l'atmosphère remplissant l'incubateur contient 5% de CO_2 .

Après une incubation de 24 heures, on ajoute simultanément le Fas Ab et le principe actif.

La quantité de Fas Ab ajoutée est de 50 ng/ml de culture.

5 Le principe actif est constitué successivement par le produit I₉ et le produit L₁₁.

Les quantités mises en oeuvre sont dans les deux cas de 0,5 mg/ml.

10 L'analyse de survie est effectuée 18 heures après le début de l'expérience.

Cette analyse de survie consiste à faire passer un volume de culture contenant 10⁴ cellules dans un appareil du type de ceux qui fonctionnent par cytométrie de flux, en l'occurrence celui commercialisé par la Société Beckton Dickinson sous l'appellation "FAC Scan cytometer".

15 Cet appareil utilise une sonde qui détecte la présence de phosphatidyl sérine à la surface des cellules; la présence de ce produit montre que les cellules en question sont apoptotiques.

20 Les résultats de cette analyse apparaissent sur les figures 9 à 12 sur chacune desquelles sont représentés trois polygones, respectivement A, B et C dont les contours sont définis pour être représentatifs de populations cellulaires distinctes; le polygone A entoure un ensemble de cellules vivantes, le polygone B un ensemble de cellules apoptotiques

25 et le polygone C un ensemble de cellules mortes.

La figure 9 illustre l'analyse de survie effectuée sur un échantillon d'un milieu de culture dans lequel on n'a ajouté ni Fas Ab, ni principe actif; il s'agit d'un témoin;

30 dans ce cas, on voit qu'il n'y a substantiellement que des cellules vivantes qui se trouvent dans le polygone A.

La figure 10 illustre l'analyse de survie effectuée sur un échantillon d'un milieu de culture dans lequel on n'a ajouté que du Fas Ab; dans ce cas, on voit que le polygone

35 B contient beaucoup de cellules apoptotiques.

La figure 11 illustre l'analyse de survie effectuée sur un échantillon d'un milieu de culture ayant été additionné de Fas Ab et de principe actif I₉; dans ce cas, on voit que le polygone B ne contient pratiquement pas de cellules apoptotiques, le polygone A contenant beaucoup de cellules vivantes et le polygone C une certaine concentration de cellules mortes.

La figure 12 illustre l'analyse de survie effectuée sur un échantillon d'un milieu de culture ayant été additionné de Fas Ab et de principe actif L₁₁; dans ce cas, on voit que le polygone B contient une grande quantité de cellules apoptotiques et le polygone C beaucoup de cellules mortes.

Les conclusions susceptibles d'être tirées de l'examen des figures 11 et 12 sont, par conséquent, que le principe actif I₉ inhibe l'apoptose Fas alors que le principe actif L₁₁ la potentialise.

Il est donc possible d'utiliser des médicaments contenant, comme principe actif, le produit I₉ par exemple pour le traitement du SIDA; on peut utiliser ceux contenant, comme principe actif, le produit L₁₁ par exemple pour le traitement du cancer et des maladies auto-immunes.

REVENDICATIONS

1. Médicament caractérisé par le fait qu'il comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace d'une substance propre à moduler les dérèglements de l'apoptose.

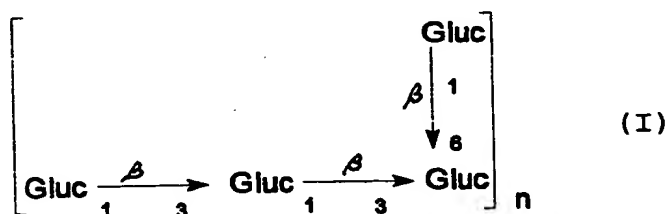
2. Médicament caractérisé par le fait qu'il comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace d'au moins une des substances saccharidiques du groupe comprenant les polysaccharides, les oligosaccharides et les monosaccharides propres à moduler les dérèglements de l'apoptose et comportant éventuellement, sur au moins certains de leurs motifs unitaires, au moins un substituant du groupe comprenant les groupements sulfate, méthyle et acétyle.

3. Médicament caractérisé par le fait qu'il comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace d'au moins l'une des substances du groupe de substances propres à moduler les dérèglements de l'apoptose et comprenant

- les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des polymères du groupe comprenant les β 1-3 glucans comportant éventuellement des ramifications β 1-6, et

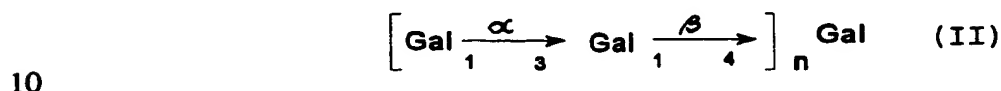
- les oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des galactanes sulfatés, notamment les carraghénanes, les agars et les porphyranes.

4. Médicament caractérisé par le fait qu'il comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace d'au moins un oligosaccharide propre à moduler les dérèglements de l'apoptose et répondant à la formule



dans laquelle n représente un nombre entier de 1 à 50, de préférence de 5 à 10 et dans laquelle le nombre de branchements varie de 0 à 3 par unité de répétition.

5 5. Médicament caractérisé par le fait qu'il comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace d'au moins un disaccharide de répétition propre à moduler les dérèglements de l'apoptose et répondant à la formule



15 dans laquelle n représente un nombre entier de 1 à 50, de préférence de 1 à 20, au moins certains des disaccharides de répétition de formule (II) pouvant comporter un ou plusieurs groupes sulfate.

20 6. Médicament caractérisé par le fait qu'il comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace du produit propre à inhiber au moins partiellement l'apoptose et obtenu par hydrolyse à partir de iota-carraghénate de sodium, ce produit étant constitué par un mélange d'oligo-iota-carraghénanes désigné par I₉, dont la teneur en oses totaux (déterminée selon Tillmans et Philippi) est de 62% et dont le profil de distribution par taille, estimé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide
25 selon Zablakis et Perez, est:

	Iota-néocarratétraose (DP 2)	6- 8%
	Iota-néocarrahexaose (DP 3)	23-27%
	Iota-néocarraoctaose (DP 4)	18-22%
	Iota-néocarradécaose (DP 5)	12-18%
30	Iota-néocarradodécaose (DP 6)	11-15%
	Oligo-iota-carraghénanes constitués par 7	- -
	à 15 disaccharides de répétition (DP 7-15)	18-22%.

35 7. Médicament caractérisé par le fait qu'il comporte, à titre de principe actif, une quantité efficace du produit propre à activer les dérèglements de l'apoptose,

obtenu par extraction aqueuse acide à partir des algues brunes et plus particulièrement d'une algue brune dénommée *Laminaria digitata*, ce produit étant constitué par un mélange d'oligo β 1-3 glucans désignés par L₁₁ et comportant de 1 à 50, de préférence de 20 à 30 unités saccharidiques, le produit en question présentant le spectre RMN montré à la figure 1.

8. Procédé de préparation d'un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose, caractérisé par le fait que l'on fait comporter à une composition galénique au moins l'un des principes actifs des médicaments selon au moins l'une des revendications 2 à 7.

9. Utilisation, en vue de la préparation d'un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose, des substances saccharidiques du groupe comprenant les polysaccharides, les oligosaccharides et les monosaccharides comportant éventuellement, sur au moins certains de leurs motifs unitaires, au moins un substituant du groupe comprenant les groupements sulfate, méthyle et acétyle.

10. Utilisation, en vue de la préparation d'un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose, des oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des polymères du groupe comprenant les β 1-3 glucans comportant éventuellement des ramifications β 1-6, et des oligosaccharides dérivés par voie enzymatique ou chimique des galactanes sulfatés, notamment les carraghénanes, les agars et les porphyranes.

11. Utilisation, en vue de la préparation d'un médicament pour le traitement des dérèglements de l'apoptose, des oligosaccharides de formule (I) et de ceux de formule (II).

12. Utilisation des produits désignés par I₉ et L₁₁ en vue de la préparation de médicaments pour le traitement des dérèglements de l'apoptose.

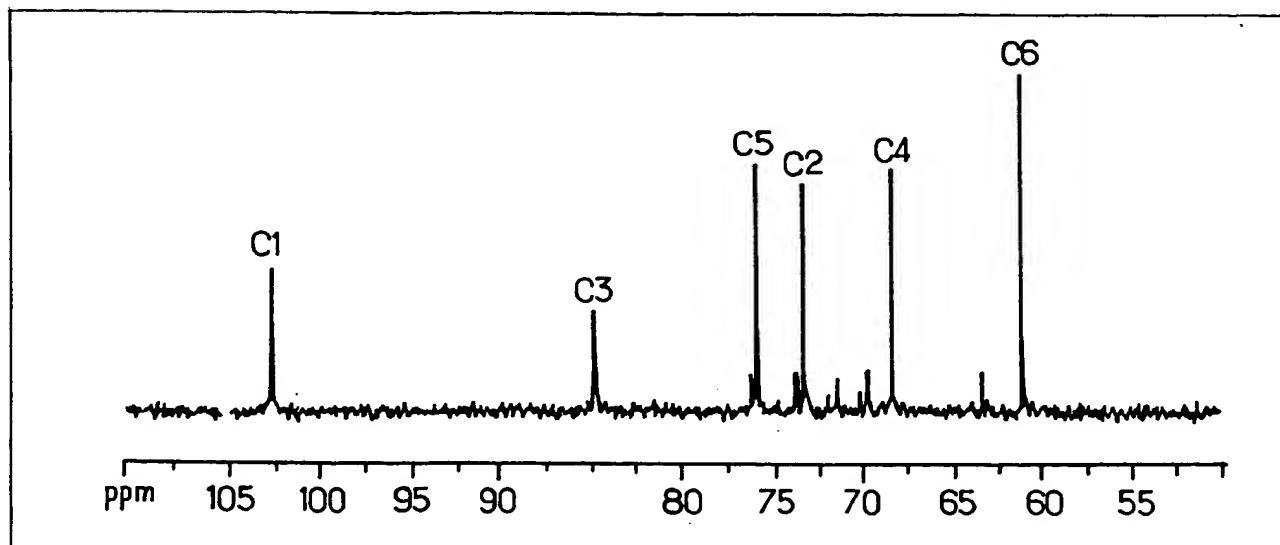


FIG.1.

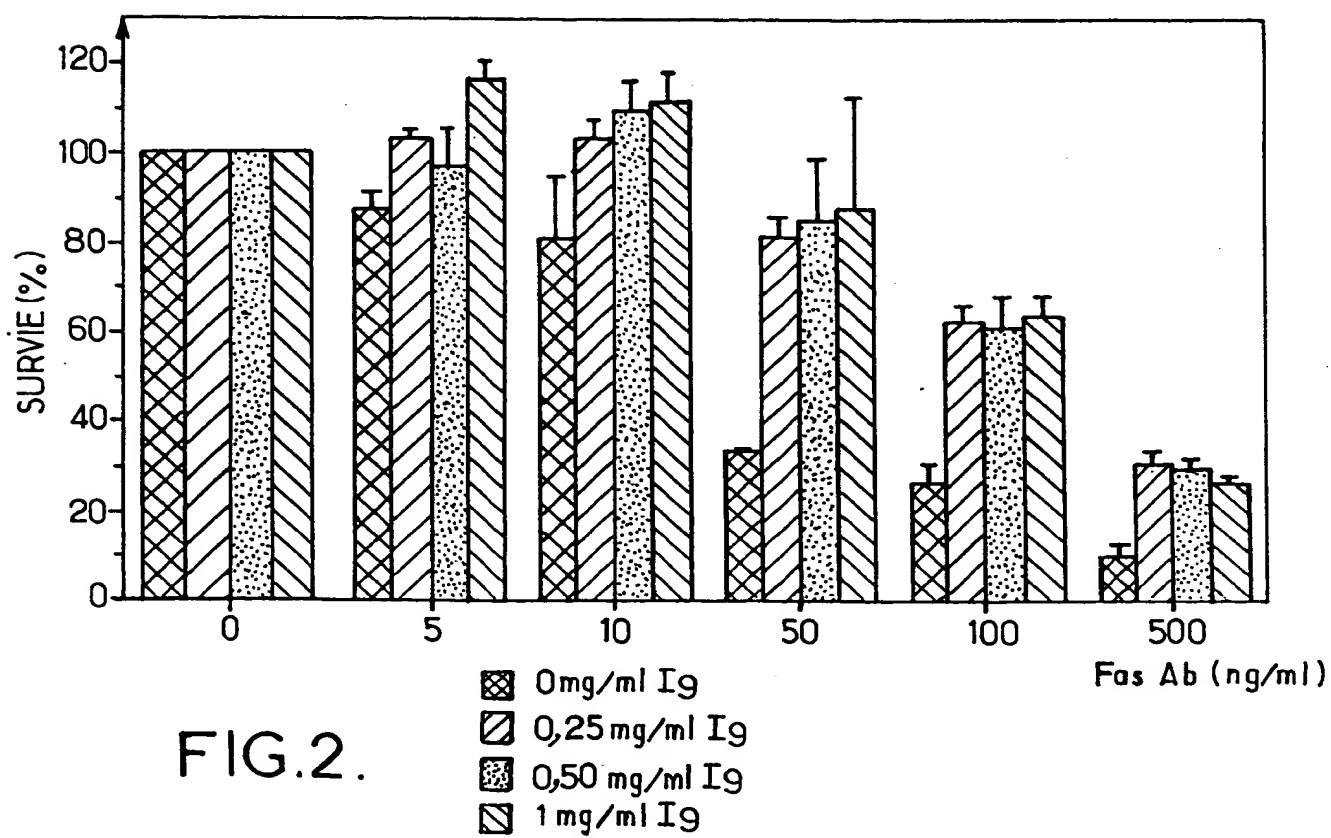


FIG.2.

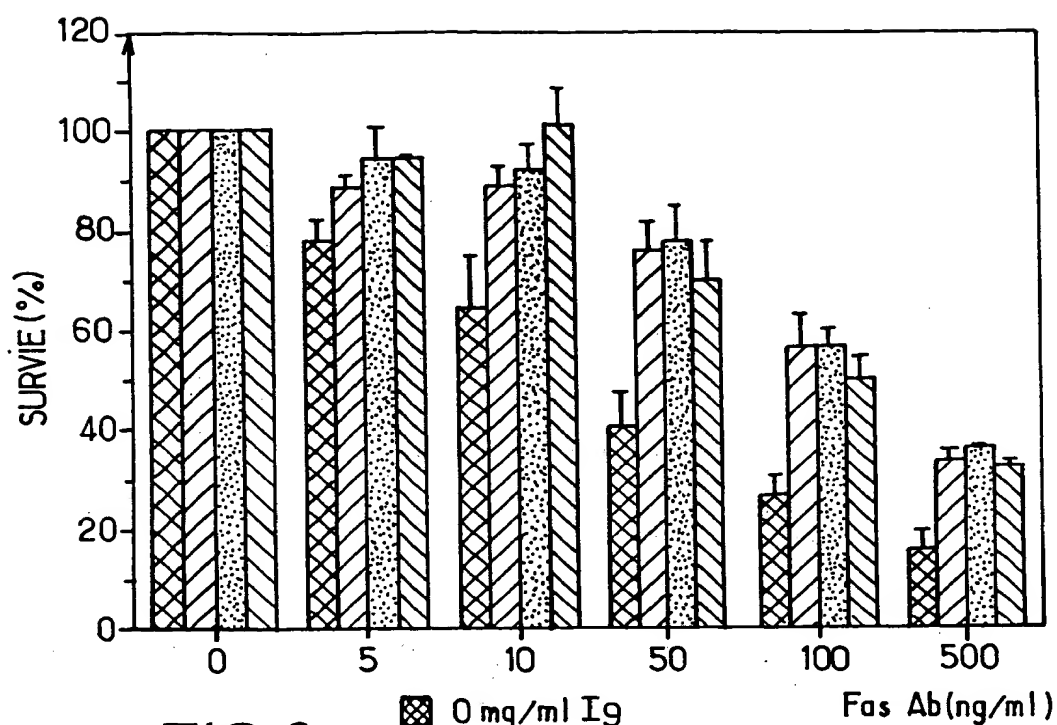


FIG. 3.

0 mg/ml Ig
0,25 mg/ml Ig
0,5 mg/ml Ig
1 mg/ml Ig

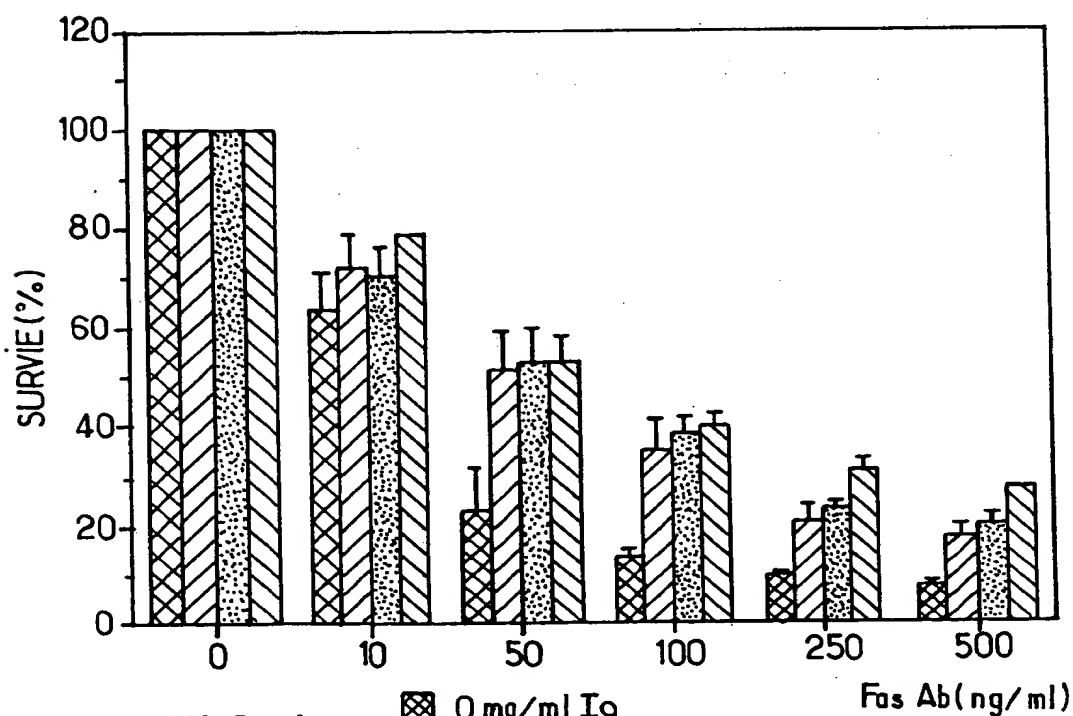
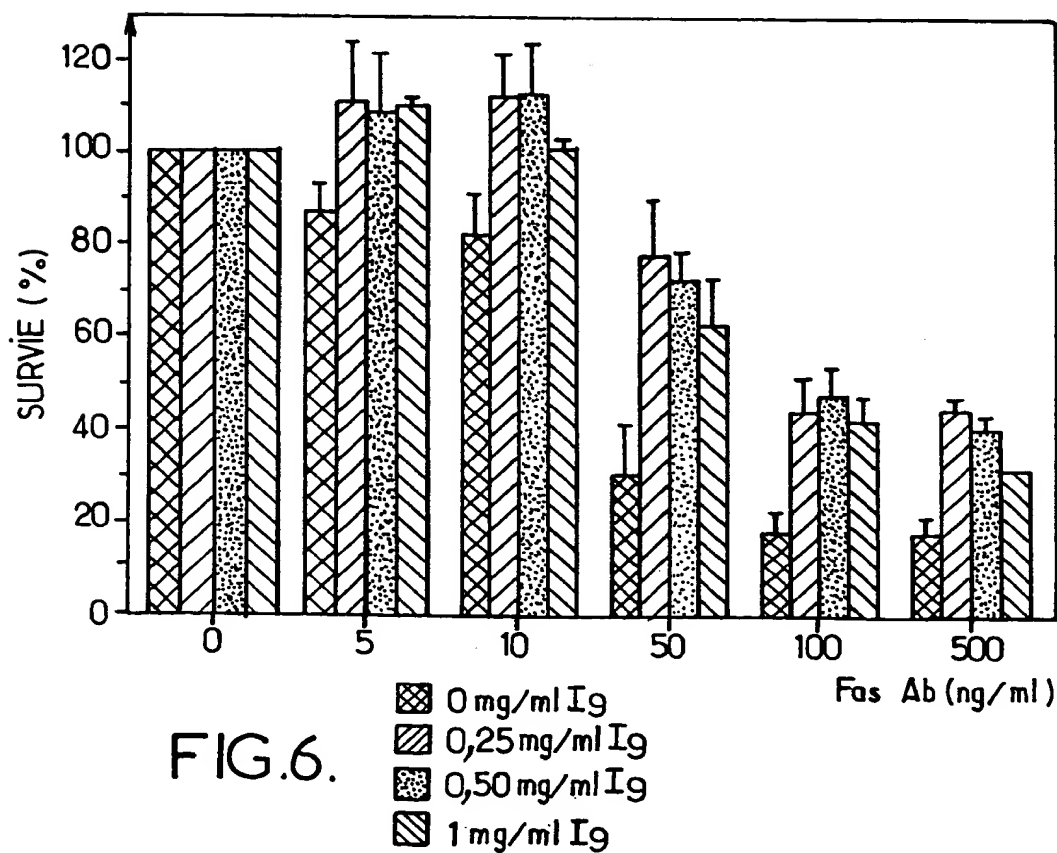
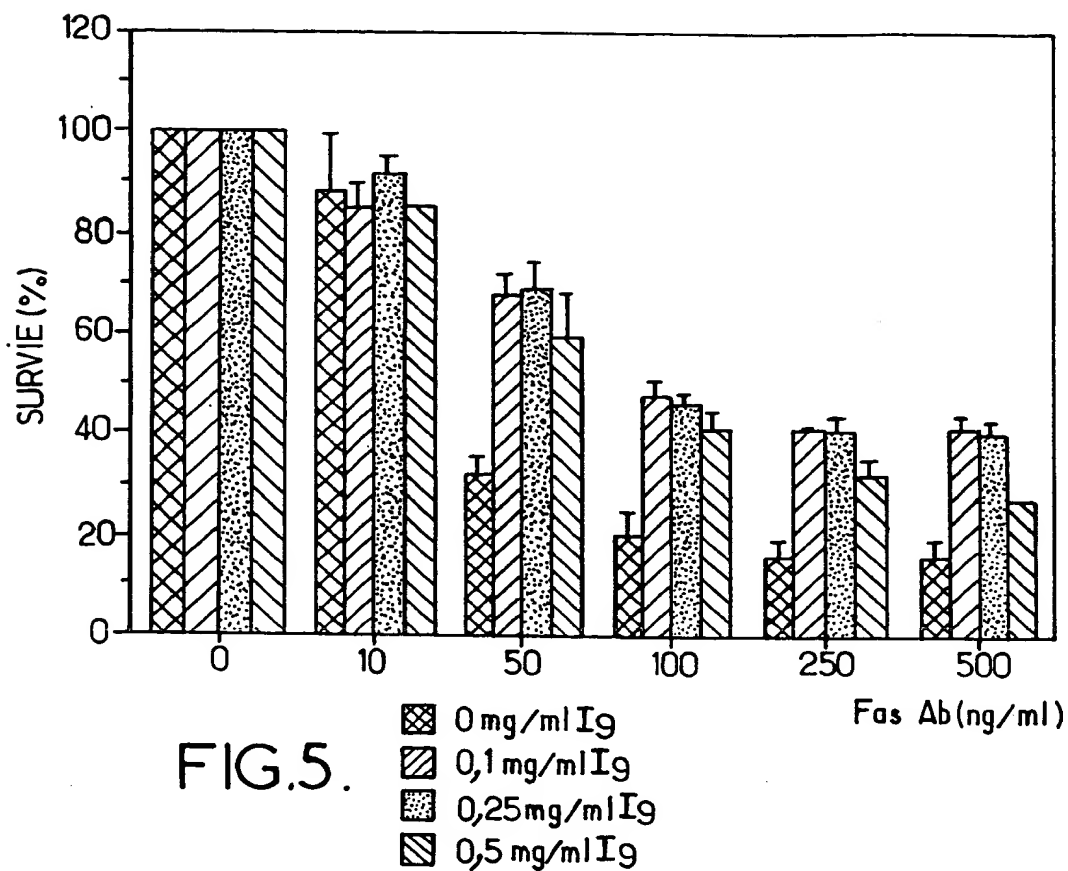


FIG. 4.

0 mg/ml Ig
0,005 mg/ml Ig
0,01 mg/ml Ig
0,05 mg/ml Ig



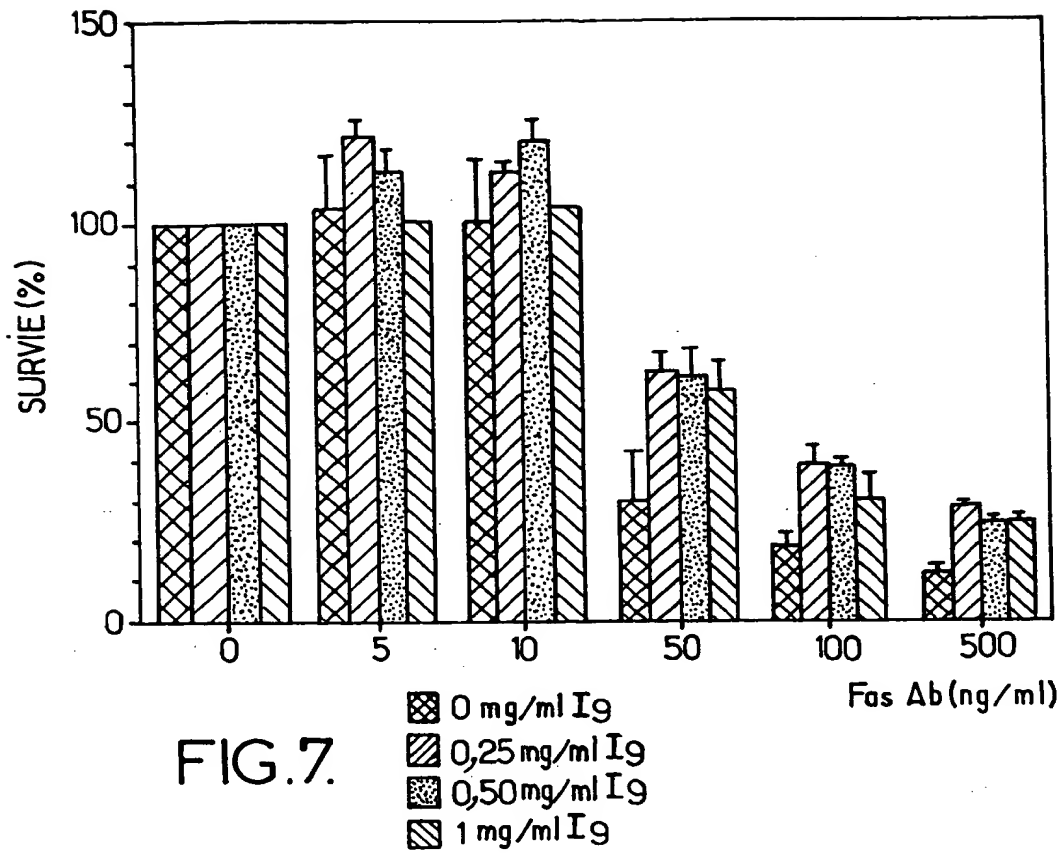


FIG. 7.

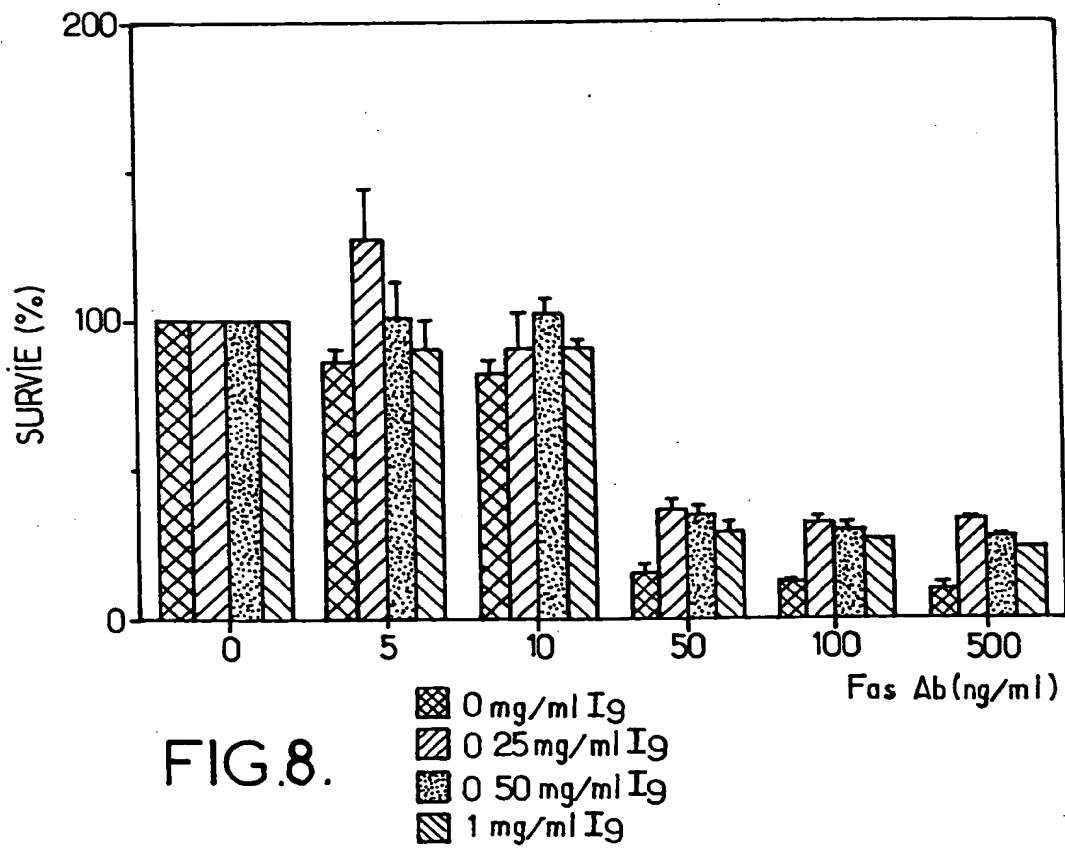


FIG. 8.

FIG.9.

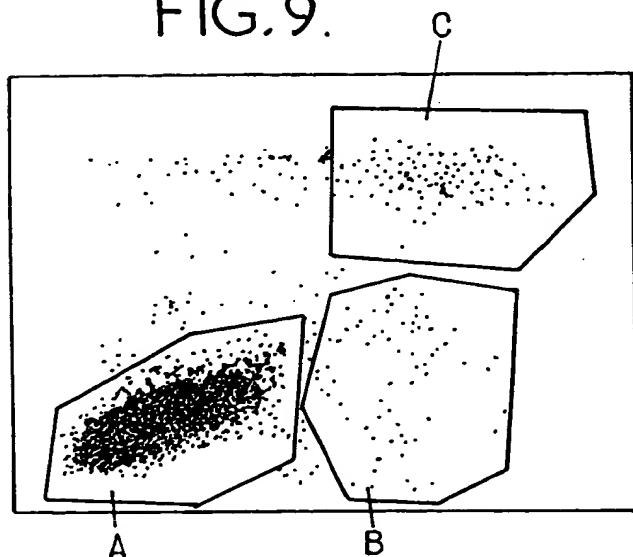


FIG.10.

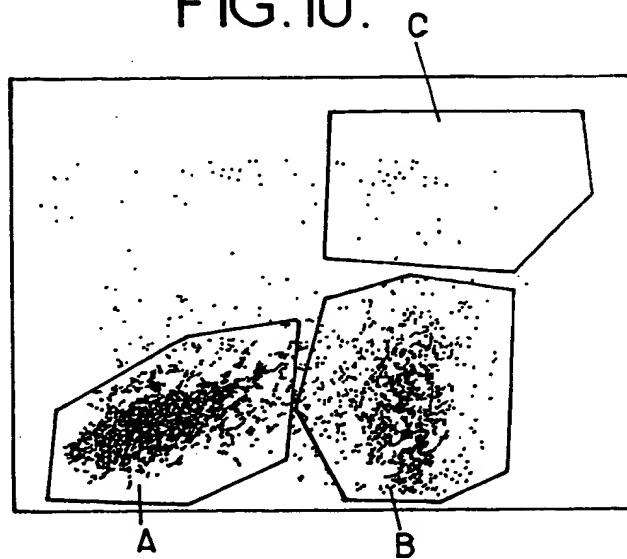


FIG.11.

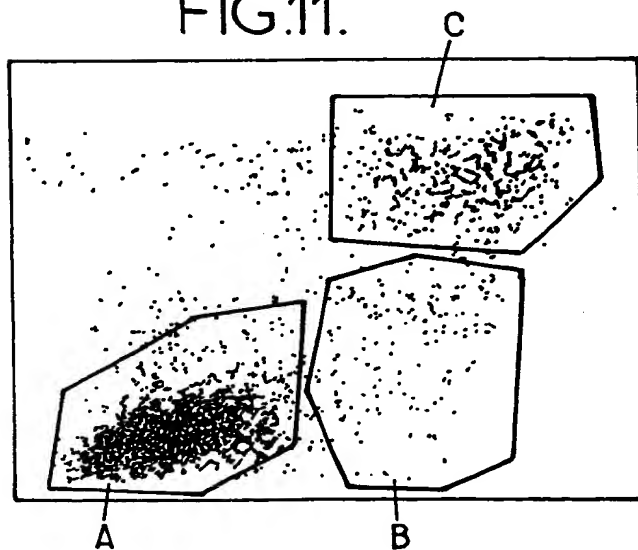


FIG.12.

